



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**Desenvolvimento e implementação de um sistema para a detecção e
quantificação absoluta de *Mycobacterium tuberculosis* usando o gene da
proteína enoil redutase NADH-dependente (*inhA*).**

Autor

Adriano Amaral Montes D'Oca

Orientador

Prof. Dr. Diogenes Santiago Santos

Co-orientador

Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Porto Alegre

2009



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**Desenvolvimento e implementação de um sistema para a detecção e
quantificação absoluta de *Mycobacterium tuberculosis* usando o gene da
proteína enoil redutase NADH-dependente (*inhA*).**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular
como parte dos requisitos para a
obtenção do grau de Mestre.

Autor

Adriano Amaral Montes D'Oca

Orientador

Prof. Dr. Diogenes Santiago Santos

Co-orientador

Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Porto Alegre

2009

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof. Diógenes Santiago Santos e Prof. Luiz Augusto Basso pela oportunidade de aprendizado, confiança depositada ao longo do trabalho e pelos ensinamentos.

Aos meus pais, Ciro e Onéia, pela criação, apoio em todas as horas e como exemplo a ser seguido.

A todos os colegas de laboratório, em especial a Eraldo Batista e Christopher Schneider, por todos os ensinamentos passados durante o trabalho e pela disposição em tirar dúvidas.

ÍNDICE

LISTAS DE ABREVIACÕES	v
RESUMO	vi
Abstract	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1.Tuberculose.....	1
1.2. Métodos diagnósticos.....	4
1.3. Detecção do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
1.3.1. A Reação em cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em Tempo Real.....	8
1.4 O Gene <i>inhA</i>	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	19
Abstract.....	23
Introduction.....	24
Methods.....	25
Results.....	28
Discussion.....	30
References.....	34
Tables and Figures.....	36
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
5. REFERÊNCIAS.....	43
6. ANEXOS.....	51

LISTA DE ABREVIÇÕES

BCG - *Bacille Calmette-Guérin*

Ct - *CyCLE Threshold*

cDNA - DNA codificante

DNA – Ácido Desoxiribonucléico

dNTPs - deoxinucleotídeos trifostato

DOTS – *Directly observed treatment short course*

E. coli - *Escherichia coli*

TB – Tuberculose

HIV - *Human immunodeficiency virus*

MDR-TB – *Multi drug resistant tuberculosis*

mRNA - RNA mensageiro

Mt – *Mycobacterium tuberculosis*

OD - Densidade Óptica

OMS- Organização Mundial da Saúde

pb – Pares de bases

PPD - *Purified Protein Derivative*

qRT-PCR - Quantificação da transcrição reversa utilizando PCR em tempo real

RNA – Ácido Ribonucléico

RT-PCR - Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase

XDR-TB – *Extensively drug resistant tuberculosis*

UV – Luz Ultravioleta

RESUMO

A tuberculose é uma das principais causas de morte ao redor do mundo envolvendo um único agente infeccioso, o *Mycobacterium tuberculosis*. A severidade desta epidemia global é exacerbada pela co-infecção com o HIV, que alterou drasticamente a epidemiologia da mesma, causando um aumento na dinâmica de transmissão, morbidade e mortalidade dos infectados, e com o surgimento de cepas multi-resistentes a drogas. No Brasil, praticamente um milhão de pessoas está infectado. Com o avanço da genética e biologia molecular, diversos tipos de métodos laboratoriais vêm sendo utilizados para o rápido diagnóstico e estudo da patogenicidade de doenças infecciosas de diversos microorganismos. A disponibilidade de seqüências genômicas de um grande número de microrganismos patogênicos proverá uma melhor compreensão de sua genética evolutiva, virulência e interações com o hospedeiro. O presente estudo tratou da implementação de um teste para detecção e quantificação absoluta de *Micobacterium sp.* a partir do emprego da reação em cadeia da polimerase associada a fluorescência. Para tanto, o gene da enoil-ACP redutase NADH-dependente (*inhA*) foi selecionado como gene identificador e primers e sonda marcada com fluoróforo (TaqMan[®]) foram desenhados. Padrões para quantificação absoluta foram produzidos a partir da clonagem da sequencia identificadora em plasmídios, sendo posteriormente empregados em ensaios para quantificação de amostras de DNA isoladas de escarro de pacientes portadores de tuberculose e células de *M. tuberculosis* em cultura. Os resultados mostraram que o sistema utilizando a *inhA* como gene identificador nas condições implementadas

foi capaz de amplificar de 10^6 a 10^1 células de *M.tuberculosis* em cultura. Comparativamente ao método da espectrofotometria, o ensaio em tempo real empregando o gene da inhA foi mais sensível, apresentando menor variação em número absolutos. Amostras de DNA (n=13) isoladas de escarro de pacientes portadores de tuberculose de ++ e +++ foram submetidas ao ensaio e foram positivamente detectadas com variação de três ordens de magnitude. Amostras de indivíduos controle saudáveis não apresentaram sinal positivo, atestando a especificidade do sistema.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, PCR em tempo real, Método diagnóstico.

ABSTRACT

Tuberculosis is one of the main causes of death around of the world, a disease caused by the pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. The severity of this global epidemic is exacerbated by the co-infection with the HIV, that drastically modified the epidemiology of the same one, causing an increase in the transmission dynamics, morbidity and mortality of infected subjects and the emergence of *M. tuberculosis* multidrug-resistant strains. In Brazil, practically one million of people is infected. With the advance of molecular biology and genetics, a diverse type of methods have been developed to allow fast diagnosis and a better understanding of the pathogenicity of infectious illnesses of several microorganisms. This study focuses on the implementation of a test to detect and quantify *Micobacterium sp.* using the polimerase chain reaction (PCR) associated with fluorescence. To this purpose, the gene of the enoil-ACP reductase NADH-dependent (*inhA*) was selected as the identification gene and primers/probe marked with fluorophores (TaqMan[®]) were designed and synthesized. Standards for absolute quantification were produced through cloning of the *inhA* sequence in plasmids and further used as standards in assays for quantification of DNA samples isolated from sputum from patients diagnosed with tuberculosis. In parallel, *M. tuberculosis* cultures were used to assess the variability of the PCR assay compared with spectrophotometry, a standard method for cell number determination. The results showed that the system using *inhA* as identification gene in the implemented conditions was capable to amplify 10^6 the 10^1 cells of *M.tuberculosis* in culture. Compared to the method of the spectrophotometry, the

real-time assay was more sensible, presenting less variation in absolute numbers. Samples DNA samples isolated from sputum of TB patients (n=13) classified as ++ and +++ according to the bacilloscopy method showed a wide range of *Mycobacterium* numbers, that reached three orders of magnitude. Importantly, DNA samples isolated from sputum of otherwise healthy individuals did not show any increase in fluorescence, which attested the specificity and reliability of the test.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Real Time PCR, Diagnostic Method.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tuberculose

A tuberculose (TB), causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, é uma das mais importantes doenças infecciosas na atualidade, constituindo um grave problema de saúde pública. O ressurgimento da TB deve-se principalmente ao aumento na incidência de resistência a drogas, surgimento da epidemia de HIV/AIDS no início da década de 1980, aumento no número de usuários de drogas injetáveis, mudanças na estrutura social, aumento do número de imigrantes de países com alta prevalência de TB em países desenvolvidos, envelhecimento da população mundial, transmissão em ambientes de aglomerados humanos, como prisões, hospitais e asilos para desabrigados e à deterioração de sistemas de saúde (1). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a TB mata mais pessoas que malária e AIDS juntas.

A OMS estima que ocorram cerca de 8 a 10 milhões de novos casos de TB e 3 milhões de mortes por ano, atingindo principalmente os adultos mais jovens e produtivos. Nesta década, estima-se que 90 milhões de pessoas desenvolverão a doença e 30 milhões morrerão se as condições atuais não forem drasticamente alteradas (2). Anualmente, a TB é responsável pela morte de 100.000 crianças e, no Brasil, ocorrem 161.800 novos casos positivos de TB. Estima-se que de hoje até 2020, mais 1 bilhão de pessoas serão infectadas, 200 milhões desenvolverão a doença, e 70 milhões morrerão, caso o controle não seja reforçado (3). A principal maneira de transmissão se dá através de partículas infectivas. Em pacientes com tuberculose ativa, a tosse caracteriza sintomas de inflamação pulmonar crônica, além de ser o principal mecanismo de disseminação do organismo para novos hospedeiros (4). Estas partículas infectivas, expelidas através da tosse, espirro ou fala de

uma pessoa com a doença ativa são propelidas do pulmão para o ar, podendo permanecer em suspensão durante algumas horas, representando uma doença altamente contagiosa (5). A infecção é normalmente transmitida de pessoa a pessoa através da inalação de partículas infectivas resultantes da formação de aerossóis de secreções respiratórias (3).

Pode-se dizer que a infecção por HIV alterou drasticamente a epidemiologia e a história “natural” da tuberculose, causando um aumento na sua dinâmica de transmissão, morbidade e mortalidade. O diagnóstico de tuberculose entre pacientes HIV positivos tornou-se mais difícil devido a fatores como: falsos negativos nos testes de tuberculina; achados atípicos em raios X torácicos de tuberculose pulmonar; tuberculose pulmonar com esfregaço de escarro negativo para bacilos álcool-ácido resistentes; tuberculose extrapulmonar (envolvendo principalmente a pleura, mediastino, pericárdio e linfonodos) (1).

Torna-se evidente que a epidemia de HIV favorece o surgimento de linhagens do bacilo da tuberculose resistentes a drogas em pacientes co-infectados, uma vez que, nestes casos, há um maior índice de abandono do tratamento, além de facilitar uma rápida disseminação destas linhagens para outras pessoas (6). Em pacientes HIV positivos infectados por *Multi-drug resistant tuberculosis* (MDR-TB), os índices de mortalidade freqüentemente superam 80%, com um intervalo entre o diagnóstico e a morte dos pacientes variando entre 4 a 16 semanas (7), fazendo com que MDR-TB seja conhecida como “a mais maligna infecção oportunista associada à infecção por HIV” (8).

O tratamento atualmente recomendado pela OMS consiste na administração combinada das drogas isoniazida, rifampicina, pirazinamida e estreptomicina (ou etambutol) durante os 2 primeiros meses, seguida por uma combinação de isoniazida e rifampicina por pelo menos mais 4 meses, ou seja, a administração de 4 drogas durante 2

meses, e 2 drogas durante 4 meses. No entanto, a longa duração do tratamento, os desagradáveis efeitos colaterais das drogas e a complacência humana com o tratamento levaram a OMS a investir em medidas de adesão universal ao tratamento, por meio de um processo conhecido como DOTS (*directly observed treatment short-course*), através do qual agentes de saúde aconselham seus pacientes, monitoram seu progresso, e observam a ingestão de cada dose da medicação (5); evitando o abandono do tratamento e posterior surgimento de cepas resistentes as drogas utilizadas.

Em 1º de setembro de 2006, a OMS, anunciou uma nova e mortal cepa de *Mycobacterium tuberculosis*, extensivamente resistente a drogas (XDR-TB) detectada em Tugela Ferri, uma cidade rural da província de Kwazulu-Natal (9), o epicentro sul-africano de infecção por HIV/AIDS. Dentre 544 pacientes estudados nessa área em 2005, 221 possuíam resistência a múltiplas drogas (MDR-TB), sendo resistentes a pelo menos duas drogas de primeira escolha, que no caso são isoniazida e rifampicina. Desses 221 casos, 53 foram identificados como XDR-TB, isto é, MDR-TB resistente a três drogas das seis possíveis, escolhidas como drogas de segunda linha (10).

Esses dados representam mais de um sexto de todos os casos de XDR-TB reportados no mundo (11). Desses 53 casos, 44 foram positivos para a co-infecção por HIV.

A sobrevivência média dos pacientes, desde o momento da coleta da saliva, foi 16 dias para 52 dos 53 casos de XDR-TB, incluindo 6 trabalhadores saudáveis, e indivíduos fazendo tratamento com antiretrovirais (12).

Os casos diagnosticados de XDR-TB representam uma pequena porção da verdadeira extensão do problema. O número de pessoas que possuem essa infecção latente é desconhecido. Estatísticas oficiais subestimam a verdadeira prevalência da XDR-TB, como as recomendações para a prescrição de condição nos quais os testes de

susceptibilidade devem ser realizados para *M. Tuberculosis* (13). As recomendações para esses testes de susceptibilidade devem ser realizadas para pacientes que já tenham feito o tratamento preconizado pela OMS para a TB, ou que após dois meses de tratamento não tenham obtido respostas positivas.

Um diagnóstico de MDR-TB e de XDR-TB pode levar diversas semanas; e questões seguem remanescentes com o que fazer com os pacientes suspeitos de estarem infectados com essa variação de tuberculose, enquanto aguardam a confirmação do resultado (13).

Uma grande quantidade de casos de cepas resistentes a isoniazida, o antituberculostático de primeira escolha para o tratamento, foram documentados em todo o mundo, além dos recentes casos de XDR-TB na África do Sul, sendo necessário o planejamento de novas drogas para o controle da doença, além da sua correta identificação para a escolha do melhor tratamento.

1.2. Métodos diagnósticos

Desde seu desenvolvimento por Robert Koch em 1882, a técnica de baciloscopia ou esfregaço de escarro para bacilos álcool-ácido resistentes sofreu poucas modificações, e continua sendo um dos métodos mais rápidos de detecção de *M. tuberculosis*. O esfregaço de escarro é uma maneira simples de diagnosticar tuberculose, além de ter baixo custo e ser de fácil acesso (1).

O teste de tuberculina (PPD), um monitoramento epidemiológico que está atualmente disseminado mundialmente, pode ser utilizado para detectar uma infecção de muitos anos atrás ou mesmo de origem recente (14), e é a única maneira de diagnosticar

uma infecção latente pelo bacilo de Koch, através de hipersensibilidade do tipo tardia contra antígenos micobacterianos (4). O teste básico de tuberculina, ou teste de Mantoux, consiste de 5 unidades de tuberculina (aproximadamente 0,1 mL) do precipitado de *M. tuberculosis* no sobrenadante da cultura (PPD) injetada intradermicamente no antebraço. Normalmente, um halo contendo entre 6 a 10 mm de diâmetro é produzido no local de aplicação da injeção, o qual ocorre normalmente após 48 a 72 horas da administração (15).

É importante salientar que a área de enrijecimento, e não a do eritema seja medida. Parece não haver risco de uma reação excessiva em indivíduos vacinados com BCG, de qualquer forma, reações severas só ocorreram em pacientes que já foram infectados com TB, previamente tratado com TB, ou que tiveram uma reação severa no passado (16). Entretanto a vacinação com BCG também produz reatividade ao PPD, fazendo com que a utilização e confiabilidade deste teste diminuam com o aumento de crianças vacinadas com BCG (14).

O diagnóstico de tuberculose consiste de sinais e sintomas, detecção por raios-X e detecção *in loco* do bacilo de *M. tuberculosis*. Atualmente a cultura bacteriana, corada através do método de Ziehl-Neelsen e o PCR (*Polymerase chain reaction*) são utilizadas para detectar o bacilo da tuberculose. Os métodos de cultura só são possíveis de realizar com mais de 100 *M. tuberculosis* presente em 1 mL de cultura. Entretanto a especificidade do método de cultura é perto dos 100%, sendo utilizado como diagnóstico final, sendo necessário de 3 a 8 semanas para cultivar a bactéria. Com isso, o método de cultura é muito caro para ser implementado em laboratórios clínicos.

O método de coloração através de Ziehl-Neelsen é um procedimento relativamente simples, rápido e com um custo reduzido. Todavia, ele necessita de 5000 a 10000 bactérias presentes em 1 mL de amostras e não distingue *M. tuberculosis* de outras micobactérias

não-tuberculosas, levando para uma sensibilidade baixa (22-78%) (17-20). A detecção por PCR ocorre diretamente na amostra clínica e não necessita um longo tempo de incubação, sendo ideal para um diagnóstico preliminar. A desvantagem do método PCR é que ela não detecta somente *M. tuberculosis* viável, mas também a não viável. Além do mais esse método não deve ser utilizado como diagnóstico definitivo (17, 21-23).

Para o diagnóstico de MDR-TB, são realizados testes de sensibilidade do bacilo a drogas antituberculose (através do sistema Bactec[®]), usando-se concentrações estabelecidas de drogas, e um controle sem drogas como referência. Durante a incubação, é realizado um monitoramento diário, onde as amostras que apresentam uma leitura estável ou decrescente representam linhagens susceptíveis, e aquelas que apresentam uma leitura crescente representam as linhagens resistentes. Outro método é o método de proporção, através do qual se pode definir com quais drogas e em quais concentrações mínimas ocorre à inibição de pelo menos 99% do crescimento bacteriano (24).

Espera-se que os métodos moleculares sejam cada vez mais utilizados para o rápido diagnóstico e estudo da patogenicidade e epidemiologia de doenças infecciosas. Com isso, haverá uma maior disponibilidade de seqüências genômicas de um grande número de microrganismos patogênicos, provendo uma melhor compreensão de sua genética evolutiva, virulência e interações com o hospedeiro (25), possibilitando assim um melhor tratamento dos indivíduos infectados.

1.3. Detecção do *Mycobacterium tuberculosis*

Diversas técnicas para detectar polimorfismos no DNA bacteriano foram utilizados para estudos epidemiológicos da transmissão da TB. A capacidade de identificar

corretamente os agentes infecciosos que causam doenças é o foco central da epidemiologia e de decisões de saúde pública, porém não existem métodos satisfatórios para armazenar esses dados (26). Desde que a bacteriologia se transformou em ciência (27), vários esforços foram feitos para assegurar que um único sistema de nomenclatura fosse utilizado como os publicados no *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (28) para o estabelecimento de um comitê internacional para a unificação dos sistemas de nomenclaturas bacteriano (<http://www.iuns.org/comcofs/comcofsbam.html>). Nem sempre existe um método correto para o processo; por exemplo, o conceito de espécies, a unidade taxonômica fundamental, e que é aplicada para as bactérias, continua sendo um assunto de muitos debates (29), em parte devido ao conceito aplicado de cruzamentos híbridos entre espécies, utilizado em muitos organismos superiores ser inaplicável para bactérias.

No caso de bactérias patogênicas, ou com importância econômica, mudanças de nomenclatura podem implicar em diversas complicações. Por exemplo, o conceito de *nomen periculosum* (nome perigoso) é aplicado como nomenclatura para bactérias que possam causar danos à saúde humana ou que possa trazer sérias conseqüências econômicas, desrespeitando a precisão biológica, sendo esse nome rejeitado. Nessa área, a tênue linha que separa espécies e subespécies é frequentemente duvidosa, sendo mais freqüente nos patógenos mais perigosos incluindo organismos como *Yersinia pestis* (30) e *Bacillus anthracis* (31).

A aceitação da teoria dos germes e subseqüentemente desenvolvimento das ciências irmãs: microbiologia e imunologia, no fim do século XIX e início do século XX, marcaram a transição para entender a bacteriologia em geral e as doenças infecciosas em particular (32).

Durante a última década do século XX, o desenvolvimento e aplicação de técnicas de análise molecular resultaram em outro rápido aumento dos conhecimentos, como a disponibilidade das seqüências completas dos genomas, sendo essa a vantagem mais evidente em relação ao século XIX (32).

Conhecimentos de genomas completos, e a da utilização de técnicas de PCR fizeram com que fosse possível analisar qualquer mudança genética em qualquer parte do genoma, por determinação direta da seqüência de nucleotídeos (32).

Isso levou a um avanço na técnica, pois os alvos de tipagem podem ser escolhidos racionalmente, e não ao acaso, e sua variação genética pode ser analisada em qualquer laboratório que tenha acesso básico à tecnologia de biologia molecular (33). Finalmente, a tecnologia de seqüenciamento é genérica e, pela construção de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação e por determinação de seqüência de nucleotídeos, qualquer organismo pode ser estudado por esse método.

Todos os numerosos métodos moleculares que estão em uso possuem diferentes desvantagens (32), tais como combinações de discriminação inadequada, limitadas número de reagentes, pouca reprodutibilidade entre os laboratórios e incapacidade de quantificar as relações genéticas entre as cepas depois de isoladas. Todas estas deficiências levaram ao desenvolvimento de diagnósticos moleculares.

1.3.1. A Reação em cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em Tempo Real

As análises moleculares podem ser de grande utilidade como determinante de prognóstico na prática clínica, desde que haja confiabilidade, rapidez e simplicidade no método aplicado. Normalmente, os estudos de amplificação gênica são realizados

utilizando o *Southern blot* ou o *dot blot*, dois procedimentos que requerem amostras em concentração elevada e de boa qualidade e requerem muito tempo até a obtenção do resultado.

Assim, verificamos que técnicas de hibridização não são as mais adequadas quando objetivamos estudar a amplificação gênica em amostras tumorais que normalmente são escassas, quando provenientes de biópsia ou aspirado medular ou de baixa qualidade, como quando o DNA precisa ser extraído de amostras envolvidas em parafina. Outro ponto desfavorável em relação às técnicas de hibridização é a morosidade do método.

O avanço da ciência sobre a compreensão dos genes trouxe para a rotina do laboratório de genética, ferramentas que permitem o diagnóstico em nível molecular. Na linha das doenças genéticas, o permanente desenvolvimento de novos protocolos tem permitido a pesquisa de pequenas alterações na seqüência de DNA, como, por exemplo, na fibrose cística.

Finalmente, a PCR tem um grande potencial na medicina forense. Sua sensibilidade torna possível utilizar uma amostra bastante pequena (traços mínimos de sangue e tecidos que poderiam conter os restos de somente uma única célula) e ainda se obter uma “impressão digital de DNA” da pessoa da qual a amostra foi coletada, podendo assim fazer comparações com aqueles obtidos de vítimas e/ou suspeitos de casos de infração penal (34).

A PCR consiste na síntese 5' – 3' repetitiva de DNA através da extensão de uma região do ácido nucléico com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores.

A amplificação de uma amostra pela técnica de PCR requer um par de iniciadores, os quatro deoxinucleotídeos trifostato (dNTPs), íons de magnésio ($MgCl_2$), que devem estar em maior concentração que os dNTPs e uma DNA polimerase termoestável para sintetizar

o DNA. As concentrações de iniciador, dNTP e magnésio são variáveis de acordo com a reação.

Vários fatores devem ocorrer durante a reação de PCR, a cada ciclo. O primeiro é a desnaturação da dupla fita de DNA que acontece quando a reação é aquecida a 92-96°C. O tempo necessário para a desnaturação depende da geometria do tubo, do termociclador, do volume da reação e da proporção de C+G (citosina e guanina) da seqüência de DNA. Nos casos em que temos altas quantidades de C+G, a adição de glicerol, utilização de Dimetilsulfóxido e o aumento do tempo de desnaturação podem melhorar o resultado da reação.

O segundo evento do ciclo de PCR é o anelamento dos iniciadores à fita de DNA que será sintetizada como molde para a nova fita. A temperatura varia de 37 a 65°C, dependendo da homologia dos iniciadores pela seqüência alvo e da composição dos iniciadores. O anelamento ocorre com sucesso quando os iniciadores estão em maior concentração que o DNA e seu tamanho são muitas vezes inferiores, assim eles hibridizam com sua seqüência complementar em um espaço de tempo bem menor que o necessário para as fitas se renaturarem.

A última fase do ciclo é a extensão, a partir dos iniciadores, por uma polimerase termoestável. Tradicionalmente, esta fase do ciclo é realizada a 72°C. O tempo necessário para copiar a fita de DNA complementar depende do tamanho do produto de PCR (35).

Os testes baseados em amplificação de ácidos nucléicos são utilizados para detectar regiões específicas do genoma de TB por amplificação de regiões específicas do DNA micobacteriano. Uma meta-análise extensa, envolvendo diversos trabalhos foi recentemente publicado, demonstrando o desempenho de testes comercialmente disponíveis e testes *in-house* para diagnóstico de escarro positivo/negativo para tuberculose (36). É evidente

nesses estudos que o principal uso da amplificação de ácidos nucléicos é restrito à confirmação da presença do bacilo da tuberculose em amostras de escarro positiva onde um pré-teste é necessário devido à grande probabilidade de pacientes infectados por tuberculose. Isso acontece predominantemente em países em desenvolvimento ou pobres onde o maior número de casos de tuberculose é reportado pela Organização Mundial da Saúde.

Além disso, grande variação nos testes demonstra que os mesmos são altamente dependentes do operador (pouca reprodutibilidade). Além disso, ambos os testes não diferenciavam entre micobactérias vivas ou mortas.

Ultimamente, o mais novo avanço tecnológico que partiu da própria técnica de PCR e que vem sendo utilizados para a identificação e quantificação de vários microorganismos, foi a PCR em Tempo Real, que permite a quantificação das amostras amplificadas, sendo de grande relevância para diagnósticos de patógenos e doenças genéticas. Dentre as vantagens, desta técnica em relação a PCR qualitativa estão à facilidade na quantificação, maior sensibilidade, maior precisão, reprodutibilidade e acurácia, velocidade na análise, melhor controle de qualidade no processo e menor risco de contaminação.

Recentemente foram desenvolvidos ensaios PCR em Tempo Real específicos para vários microorganismos (37, 38) com a finalidade de aperfeiçoar o diagnóstico. A técnica da PCR em Tempo Real quantitativo é uma metodologia confiável, capaz de quantificar a concentração do produto de PCR gerado durante cada ciclo da reação. Para tanto, são necessários um método de detecção do acúmulo de produto de PCR e um termociclador acoplado a um computador para registrar os resultados a cada novo ciclo de reação.

Antes do instrumento de PCR em Tempo Real ser desenvolvido, a reação de PCR quantitativa era realizada adicionando-se Brometo de Etídio ou qualquer outro intercalante

de DNA ao produto de PCR num ciclo da reação que era determinado empiricamente. Este produto de PCR era aplicado a um gel de agarose e as bandas encontradas quantificadas por algum método densitométrico. A reação de PCR competitiva aumentou a capacidade de quantificação, mas nenhum destes métodos fornecia dados quantitativos realmente confiáveis.

O primeiro relato de PCR em Tempo Real foi feito em 1993 por Higuchi (39), que usando Brometo de Etídio como intercalante durante a reação de PCR, e um termociclador modificado, para irradiar as amostras com luz ultravioleta (UV), conseguia detectar a fluorescência resultante da reação com uma câmera acoplada. O gráfico resultante da fluorescência gerada em função do número de ciclos representa de maneira precisa a concentração de produtos de PCR que está sendo gerado a cada ciclo da reação, exceto nos ciclos iniciais, ou seja, aqueles que precedem à fase exponencial.

A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador com sistema ótico para a excitação da fluorescência e na coleção da emissão e um computador com um software para a aquisição de dados e análise final da reação. Estas máquinas, disponíveis de diversos fabricantes, diferem na capacidade da amostra (96 poços padrão, processamento de poucas amostras ou requerem tubos capilares de vidro especializados), no método de excitação (lasers ou fontes claras do espectro largo com filtros ajustáveis), e na sensibilidade total.

Apesar de precisa e mais confiável que as demais metodologias utilizadas para quantificação até então, esta técnica apresentava alguns inconvenientes, pois, detectava a fluorescência produzida por produtos de PCR não específicos, além do uso de uma substância carcinogênica, o brometo de etídio.

A PCR em tempo real realiza a quantificação destes ácidos nucléicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação. O ponto onde o ciclo atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (Ct). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência.

Assim, outras técnicas foram desenvolvidas a fim de aprimorar o método, porém mantendo o mesmo princípio. Atualmente, os métodos mais utilizados são os corantes intercalante SYBER Green I e as sondas TaqMan[®], molecular beacons e D-LUX[®] (40).

As reações são caracterizadas por uma amplificação logarítmica da seqüência alvo, que é aumento das cópias de PCR seguido por uma fase platô mostrando um rápido decréscimo a zero do número de cópias amplificadas por ciclo. Entretanto, as análises da PCR não nos fornecem informações sobre a atividade biológica do gene produto (proteínas), estudos genômicos funcionais têm demonstrado uma correlação entre a função de uma proteína e os padrões de expressão desses genes (40). O conceito de PCR em “tempo real” consiste na detecção do acúmulo dos produtos da PCR. O sistema da PCR em tempo real é baseado em sondas e *primers* que permitem alta especificidade na técnica. O desenvolvimento de sonda fluorogênicas eliminou a necessidade de processamento pós-PCR como ocorria em sistemas antigos. Duas técnicas principais estão disponíveis, as quais exploram as fases de extensão ou de anelamento, respectivamente, para gerar a emissão de fluorescência. Em ambos os casos o sinal de fluorescência aumenta com cada ciclo de amplificação da PCR (41).

A transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) é um método *in vitro*, utilizado para amplificar enzimaticamente seqüências definidas de RNA ou DNA (42). A PCR em tempo real tem sido adotada em estudos de expressão de genes que

requerem alta sensibilidade e exatidão na quantificação dos níveis de mRNA de uma pequena amostra de tecido (43, 44). Portanto, ensaios baseados em RT-PCR constituem atualmente no método mais efetivo e sensível para caracterizar ou confirmar o padrão de expressão do gene de interesse e comparar os níveis de expressão em diferentes amostras. A tecnologia de quantificação da transcrição reversa utilizando PCR em tempo real (qRT-PCR) tem recentemente sido utilizada na quantificação da expressão de genes em tumores, tendo uma primordial importância na investigação de padrões de genes responsáveis pelo desenvolvimento do câncer, progressão e respostas ou resistência ao tratamento. Especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade serão características qualitativas mais importantes para o uso desta tecnologia em diagnóstico clínico (41). Os fluoróforos são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico. Os sistemas de detecção da PCR em Tempo real utilizam estas moléculas que permitem o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos. TaqMan[®] é uma sonda (fragmento de DNA marcado usado para hibridizar com outra molécula de DNA) utilizada para detectar seqüências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease 5' – 3' da *Taq* DNA polimerase.

Durante a PCR em tempo real a sonda TaqMan[®] hibridiza com a seqüência da fita simples de DNA complementar e alvo para a amplificação. No processo da amplificação a sonda TaqMan[®] é degradada devido à atividade exonuclease 5'- 3' da *Taq* DNA polimerase, separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão. A separação do fluoróforo do *quencher* resulta em um aumento da intensidade da

fluorescência. Assim, durante o processo de amplificação a emissão de luz é aumentado de forma exponencial. Esse aumento da fluorescência ocorre apenas quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da seqüência alvo é estabelecida (48).

A reação com a TaqMan[®] é considerada um método sensível para determinar a presença ou ausência de seqüências específicas (46).

A aplicação em diagnósticos, como à detecção de patógenos, ou doenças, torna-se interessante uma vez que esta técnica permite a quantificação e rapidez do resultado, pois não mais requer a detecção em gel de eletroforese, necessário na análise da PCR.

Utilização da PCR em Tempo Real em tempo real tem as seguintes aplicações:

- Identificação de alelos em DNA genômico;
- Análise de seqüências virais, bacterianas ou de protozoários a partir de várias fontes;
- Análise de patógenos em alimentos;
- Análise de produtos transgênicos;

1.4 O Gene *inhA*

O gene *inhA* é o principal alvo molecular de ação da isoniazida, um dos fármacos mais utilizados no combate à tuberculose. A enzima *inhA* catalisa a transferência de um átomo de hidrogênio para o substrato alocado em seu sítio catalítico usando NADH, que é um agente redutor encontrado em inúmeros processos bioquímicos nos seres vivos, como fonte de hidrogênio.

O gene que codifica enoil-ACP redutase NADH-dependente do sistema FASII (síntese de ácidos graxos tipo II) codifica a proteína InhA que está diretamente envolvida na biosíntese de ácidos micólicos. O produto do gene *inhA* é a proteína enoil-ACP redutase

NADH-dependente que catalisa a redução da cadeia 2-transenoil possuindo no mínimo 12 átomos de carbonos (47, 48). Essa atividade enzimática corresponde ao último passo de cada elongação de dois carbonos na via de biossíntese de ácidos graxo.

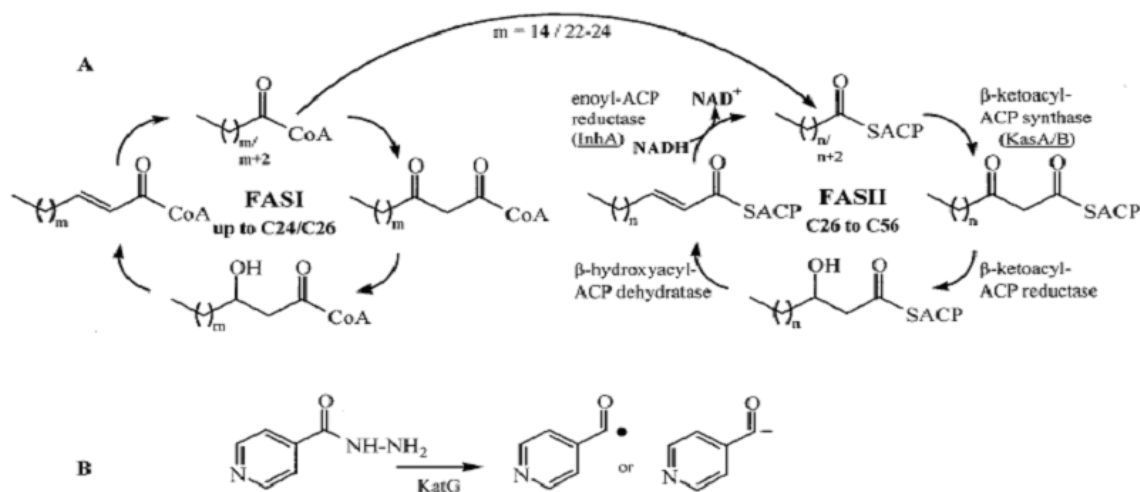


Figura 1: Sistema de biosíntese de ácidos graxos em micobactérias (49).

A isoniazida (INH) continua sendo a principal droga no tratamento e controle da proliferação da Tuberculose, mesmo com o aumento de casos de pacientes resistentes à droga (50).

Em 1952 foi descoberto que a izoniazida possuía atividade antituberculostática, em testes aleatórios no qual o alvo de ação é desconhecido (51, 52). Estudos preliminares demonstraram que a INH inibe a síntese de ácidos micólicos, α -alquil β -hidroxi e ácidos graxos de cadeia superior (60 a 90 carbonos de comprimento) que cobre a superfície da micobactéria (53, 54).

Uma das principais características de patogenicidade encontrada na *M. tuberculosis* é o seu envelope celular altamente distinto de outros organismos (55). Sua membrana

citoplasmática é encapsulada por uma camada rígida de peptídeoglicano que se encontra covalentemente ligada ao arabinogalactano, que por sua vez encontra-se ligado aos ácidos micólicos, um das principais características das micobactérias (56).

Os ácidos micólicos tornaram-se uma das principais características de definição taxonômica de muitos gêneros como *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. Ácidos micólicos são ácidos graxos β -hidróxi, α -alquil de alto peso molecular, apresentando-se frequentemente como ésteres ligados em blocos de tetramicolilpentaarabinosil nas micobactérias. As características principais que distinguem os ácidos micólicos de *M. tuberculosis* dos presentes em outros gêneros são: sua extensão, apresentando de 70 a 90 carbonos e a ramificação α de 20 a 26 carbonos; a porção de ácidos meromicólicos contém um a dois grupamentos, comumente ligações duplas ou anéis ciclopropanos; podem conter funções oxigenadas em adição ao grupo β -hidróxi e ramificações metil na cadeia meromicolato (57). O principal alvo da Isoniazida é o produto do gene *inhA*, que se localiza após a ORF que codifica a β -cetoacil redutase (*MabA*) no operon *inhA* (58).

Com isso, propomos o primeiro passo para a utilização e implementação do PCR em tempo real empregando o gene *inhA* como identificador para a detecção e quantificação de *Mycobacterium tuberculosis* como uma alternativa aos métodos diagnósticos utilizados atualmente na rotina clínica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral da realização desse trabalho é o desenvolvimento e validação de um método rápido e confiável para utilização em diagnóstico para *Mycobacterium tuberculosis* através do gene *inhA* utilizando PCR em tempo real.

2.2 Objetivos Específicos

1. Validação de um sistema para detecção e quantificação de *Mycobacterium tuberculosis* empregando o gene *inhA*;
2. Comparação com método de cultura.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Title of the article

Validation of a system for detection and absolute quantification of *Mycobacterium tuberculosis* using the enoyl-acyl carrier protein gene (*inhA*).

J Bras Pneumol

Development and validation of a system for detection and absolute quantification of *Mycobacterium tuberculosis* using the NADH-dependent enoyl-(acyl-carrier-protein) reductase gene (*inhA*).

Desenvolvimento e implementação de um sistema para a detecção e quantificação absoluta de *Mycobacterium tuberculosis* usando o gene da proteína enoil redutase NADH-dependente (*inhA*).

1. Adriano A. Montes D'Oca, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CP-BMF), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS – Porto Alegre (RS) Brasil.
2. Christopher Z. Schneider PhD, Postdoctoral Fellow, Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CP-BMF), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS – Porto Alegre (RS) Brasil.
3. Eraldo L. Batista Júnior PhD, Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, (CP-BMF), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS – Porto Alegre (RS) Brasil.
4. Luiz Augusto Basso PhD, Programa em Biologia Molecular e Celular, Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CP-BMF), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS – Porto Alegre (RS) Brasil.
5. Diógenes S. Santos PhD, Faculdade de Farmácia, Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CP-BMF), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS – Porto Alegre (RS) Brasil.

Address for correspondence: Prof. Dr. Diógenes S. Santos, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Av. Ipiranga 6681 – TECNOPUC – Prédio 92A, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil.

Phone/Fax: +55 51 3320 3629

E-mail addresses: diogenes@pucri.br.

Resumo

Objetivo: O presente estudo tratou da implementação de um teste para detecção e quantificação absoluta de *Micobacterium sp.* a partir do emprego da reação em cadeia da polimerase associada a fluorescência. **Métodos:** o gene da enoil-ACP redutase NADH-dependente foi selecionado como gene identificador e primers e sonda marcada com fluoróforo (TaqMan[®]) foram desenhados. Padrões para quantificação absoluta foram produzidos a partir da clonagem da sequência identificadora em plasmídios, sendo posteriormente empregados em ensaios para quantificação de amostras de DNA isoladas de escarro de pacientes portadores de tuberculose e células de *M. tuberculosis* em obtidos de culturas. **Resultados:** o sistema utilizando a *inhA* como gene identificador nas condições implementadas foi capaz de amplificar de 10^6 a 10^1 células de *M. tuberculosis* em cultura. Comparativamente ao método da espectrofotometria, o ensaio em tempo real empregando o gene da *inhA* foi mais sensível, apresentando menor variação em número absolutos. Amostras de DNA isoladas de escarro de pacientes portadores de tuberculose de ++ e +++ foram submetidas ao ensaio e foram positivamente detectadas com variação de três ordens de magnitude. Indivíduos controle saudáveis não apresentaram sinal positivo, atestando a especificidade do sistema. **Conclusões:** o emprego do gene *inhA* para detectar e quantificar *Mycobacterium sp.* mostrou-se confiável e sensível. Amostras de DNA isoladas de escarro de pacientes saudáveis não apresentaram aumento na fluorescência, atestando sua especificidade frente a outros patógenos.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; PCR em tempo real; Tuberculose, diagnóstico; enoil redutase NADH-dependente (*inhA*).

Abstract

Objective: This study dealt with the implementation of a test for detection and absolute quantification of *M. tuberculosis* using the polymerase chain reaction (PCR) associated with fluorescence. **Methods:** the gene encoding the NADH-dependent enoyl-(acyl-carrier-protein) reductase (*inhA*) enzyme was selected as the identification gene, and primers/probe marked with fluorophores (TaqMan[®]) were designed and synthesized. Standards for absolute quantification were produced by cloning the *M. tuberculosis inhA* sequence in plasmids, which were further used as standards in assays for quantification of DNA in samples isolated from sputum of patients diagnosed with TB. In parallel, *M. tuberculosis* cultures were used to assess the variability of the PCR assay compared with measurement by spectrophotometry, a standard method for cell number determination. **Results:** under the conditions tested, the system using *inhA* as the identification gene was able to amplify 10^6 to 10^1 cells of *M. tuberculosis* in culture. Compared to the spectrophotometric method, the real-time assay was more sensible, presenting less variation in absolute numbers. DNA samples isolated from sputum of TB patients, classified as ++ or +++ according to the bacilloscopy method, showed a wide range of *M. tuberculosis* cell numbers that reached three orders of magnitude. **Conclusions:** the method employing the *inhA* gene to detect and quantify *Mycobacterium sp.* seems reliable; DNA samples isolated from sputum of otherwise healthy individuals did not show any increase in fluorescence, which attested the specificity of the test.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; Real-Time PCR; Tuberculosis, diagnosis; NADH-dependent enoyl-(acyl-carrier-protein) reductase gene (*inhA*)

Introduction

Tuberculosis (TB) remains a leading cause of morbidity and mortality around the world. According to World Health Organization reports, from 8 to 9 million new infections and 2 million deaths occurred worldwide in 2005, and more than 80% of all TB patients lived in Sub-Saharan Africa and Asia (1). It is believed that approximately one-third of the world's population is infected with *M. tuberculosis* in a latent, asymptomatic form. (2). The severity of this global epidemic is exacerbated by the concomitant epidemic of HIV infection and the emergence of *M. tuberculosis* multidrug-resistant strains. The ability to properly identify infectious agents which cause disease in populations at risk is a major goal of epidemiology studies and public health decisions.

Different methods have been advocated to detect and diagnose infection by *M. tuberculosis*. The tuberculin test, an epidemiological monitoring that is nowadays worldwide known, has been used to detect an infection even of recent origin, and it is the only way to diagnose a latent infection by the TB bacillus (3). The staining method developed by Ziehl-Neelsen is a quite simple, quick, and cheap procedure; however, it needs from 5,000 to 10,000 bacteria be present in 1 ml of a clinical sample, which leads to low sensitivity (22-78%) (4-7). All the diagnosis methods that are currently in use have different disadvantages (9), e.g., inadequate combinations of discrimination, limited number of reagents, low reproducibility in different laboratories, and inability of identifying genetic relationships between strains after isolation.

Detection of *M. tuberculosis* by nucleic acid amplification tests is attractive owing to the possibility of directly detecting the TB bacilli in clinical respiratory specimens. PCR-based assays for detection of *M. tuberculosis* have both sensitivity and specificity of conventional microbiological culture, but have the additional advantage of being faster (8). Knowledge

of complete genome sequences and use of the PCR technique made it possible to analyze genetic variations in genomes by direct determination of nucleotide sequences of specific genes (9), which has led to significant advances in the field.

Here, we show a first step toward the development and implementation of a quantitative, nucleic acid-based detection approach using the *M. tuberculosis* NADH-dependent enoyl reductase gene (*inhA*) as the identification gene in a PCR test associated with fluorescence.

Methods

Subjects involved in the present study were selected from patients consecutively admitted in the Sanatório Partenon ambulatory (Porto Alegre, RS, Brazil) previously diagnosed with TB by the Ziehl-Neelsen method (smear). This project was fully approved by the Ethics Committee Council of the Sanatório Partenon. Individual who entered the trial received thorough information about the purpose of this study and agreed to enroll, signing and Informed Consent. Samples were classified according to the number of bacilli per field as recommended (++, +++). After proper diagnosis, patients were asked to spit in a sterile container that was then closed and labeled. Samples not processed on the very day of collection were stored a freezer (-20°C) for up to a week.

DNA isolation from cells of the sputum (3-5 ml per patient) involved material obtained from 13 individuals consecutively admitted at the Sanatório Partenon for diagnosis and treatment of TB. All of them were originally diagnosed as TB carriers and classified as ++ e +++ based on the smear test. Each sputum sample was transferred to 50-ml Falcon tubes, received an equal volume of 4% NaOH, and was incubated at room temperature for 30 minutes. Next, the same volume of 4% HCl was added to the sample, and the mixture was centrifugated for 10 minutes at 13,000 rpm. The protocol for DNA isolation was followed

according to the manufacturer's instructions (DNeasy® Tissue Kit, Quiagen, USA). To that end, the supernatant was discarded and the pellet was re-suspended in 180 µl of lysis buffer (20 mM Tris-Cl, pH 8, 0,2 mM EDTA sodium, 1.2% Triton® X-100, and 20 mg/ml lysozyme). The mixture received proteinase K and was further incubated for 30 minutes at 37°C. Proteinase K was inactivated and ethanol (96-100%) was added. The mixture was then transferred to mini columns and subjected to successive washes until elution. The DNA was stored at -20°C until further processing.

M. tuberculosis was cultured according to standard procedures. For small-volume cultures, *M. tuberculosis* H37Rv was inoculated in 10 ml of Middlebrook 7H9 (Difco) liquid medium supplemented with 10% (v/v) OADC (oleic acid, albumin, dextrose, catalase; Becton Dickinson) and 0.05% (w/v) Tween 80 (Sigma) in a 50-ml tube. Cultures were incubated at 37°C up to an optical density of ~ 0.4-0.5 for absorbance at 580 nm. The spectrophotometric measurements were made in disposable plastic cuvettes in a total volume of 1 ml and the conversion factor used was of $0.4 \text{ OD}_{580} = 2.5 \times 10^8$ cells. The collected cells were centrifuged during 10 minutes at 7,500 rpm. The DNA was isolated as described above. Approximately 1.5 ml of *M. tuberculosis* culture was collected and centrifuged for 5 minutes at 5,000 rpm, and the supernatant was discarded. The pellet was re-suspended in PBS (200 µl), incubated at 90°C for 15 minutes, and centrifuged again for 3 minutes. The supernatant was discarded and the pellet was lysed by treatment with proteinase K. After this, ethanol (96-100%) was added and then the mixture was transferred for the chromatographic column and centrifuged at 8,000 rpm for 1 minute. After successive washes, the DNA retained on the membrane of the column was eluted with 100 µl of buffer.

The TaqMan assay was designed according to standard procedures, using a primer/probe design software (Primer Express, Applied Biosystems, Foster, CA, USA). The genomic sequence of the *M. tuberculosis inhA* gene (accession # DQ056349) was uploaded into the software and the design of primers and probe was performed by the software according to optimum standard cycling conditions established for the thermocycler used (denaturing temperature at 95°C and annealing/extension at 60°C). The designed sequences were then submitted to a primer/probe synthesis service (Custom-Assays, Applied Biosystems, Foster, CA, USA). The primers (F5'-cggcgtattcgtatgcttcgatg-3', R5'-catgccgacgatggaacct-3') and a FAM-labeled probe (5'-ctgccgatcatgaacc-3') were synthesized so as to flank a 74-bp region of the *inhA* gene. Sequence detection was carried out by running DNA samples in a thermocycler (ABI 7500, Applied Biosystems, Foster, CA, USA) using a 50-cycle 2-step PCR protocol (95°C-40 s/60°C-60 s). The amplification mixture also contained appropriate concentrations of buffer, dNTPs, MgCl₂, recombinant Taq DNA polymerase and ROX internal normalization control (TaqMan Master Mix, Applied Biosystems, Foster, CA, USA).

The standards for absolute quantification were obtained from the previous amplification of *M. tuberculosis* genomic DNA, targeting the *inhA* sequence. Therefore, primers were designed to flank the sequence of recognition covered by the primers and probe TaqMan to *inhA*, adding a margin of 68 pairs of upstream basis and 73 pairs of downstream basis from primer forward and reverse from the set TaqMan, respectively (total amplicon size = 200 bp). The primers (F-5'-accgggatgggcatcaaccg-3', R-5'-gcgctcttggcgaccgtcatccagttg-3') were used in a final concentration of 300 nM in the 50- μ l amplification reaction mix containing 10 mM of dNTPs, 2 mM of MgCl₂, 2 units of Taq DNA polymerase blend (Platinum High Fidelity®, Invitrogen, Carlsbad CA, USA), buffer and 500 ng of *M.*

tuberculosis genomic DNA. The reaction was maintained by an initial cycle of 94°C for 10 minutes, 28 cycles of 94°C (30 s), 59°C (30 s), and 68°C (45 s) followed by a final step of 68°C for 15 minutes. The amplification products were separated by electrophoresis in 1% agarose gel, stained with ethidium bromide, and checked in a UV transilluminator for the amplicon (200 pb). The corresponding bands were isolated from the agarose gel, purified, and TA-cloned (RBC Bioech); nearly 100 ng of the amplicon of the purified *inhA* was incubated with 25 ng of the vector and two units of T4 DNA ligase, ATP and buffer for 12 hours at 15°C. The recombinant vectors were used to transform *E. coli* cells through electroporation and propagated in LB agar plates containing ampicillin (50 µg/ml) for 12 hours at 37°C. The colonies grown overnight were propagated in LB liquid medium containing ampicillin (50 µg/ml) for 12 hours at 37°C with constant shaking. The culture (5 ml) was then centrifuged (10,000 rpm) and the pellet lysed for plasmid purification. The plasmid DNA concentration was determined by fluorimetry (QuBit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the absolute numbers of plasmid molecules calculated as previously reported (Yun et al. 2006). Dilution of the stock plasmids was carried out (2×10^5 units of plasmid/µl) and aliquoted. Serial dilution of plasmids was set from 10^6 to 10^1 cells for real-time PCR loading.

Results

To evaluate the TaqMan[®] assay using the *inhA* sequence as the identifier gene, three samples of *M. tuberculosis* cultures kept in parallel were evaluated by a standard method and compared to the generated quantification of the system used in Real-Time. As described in Materials and Methods, the obtained cell cultures were measured in suspension through spectrophotometry as described above (12). The results, as can be observed in

Table 1, were in fact close in both methods. However, a tendency in the Real-Time PCR technique was noticed, in presenting higher absolute quantitative values compared to the OD measure only. It was also observed that absolute numbers obtained by PCR from three independent cultures were less scattered, pointing out a lower dispersion and higher reproducibility. Besides that, as observed by serial dilution of cell numbers, the system was able to detect up to 10 DNA molecules of *M. tuberculosis* as determined by the serial dilution (Fig. 1).

The amplification results showed that there was a variable number of *M. tuberculosis* DNA molecules in the sputum of ill patients, as can be observed in Table 2. Since only 1 μ l of DNA was used in the amplification assay, the numbers obtained by Real Time were further multiplied by 1,000 to get molecules per ml. There was a significant variation in total numbers of cells detected, which reflected differences in the cycle threshold (Ct) based on variable orders of magnitude (Figure 1A). No correlation could be established between the absolute numbers of DNA molecules and the bacilloscopy classification (++ and +++). Samples classified as +++ ranged between 2.8×10^7 and 1.11×10^5 cells (Ct = 25.12 to 37.55 respectively), whereas the only two samples that were scored ++ had 4.09×10^5 and 9.69×10^6 cells (Ct = 32.56 and 28.59), respectively. On the other hand, DNA isolated from healthy individuals did not present any sign of amplification (Figure 2B), attesting the specificity and stringency of the system, as a result of the lack of similarities between the primers/probe used and other pathogens and/or eukaryotic genes likely present in the pool of isolated DNAs.

Discussion

Considering the increasing difficulty in performing fast tests with high specificity and sensibility for detection of *M. tuberculosis* in suspected TB cases, this work proposes the development and validation of a system for detection and quantification of *M. tuberculosis* using the *inhA* gene. The tested approach can be used as a diagnosis method to be implemented in laboratories as an alternative or complement to the diagnosis methods available nowadays, that might lead to false negative cases, i.e., as in the case of the tuberculin tests and smear (1). There have not been many significant advances in TB diagnosis since the development of the smear test by the Ziehl-Neelsen technique. Besides, molecular tools can offer advantages over conventional techniques such as conventional microbiological culture, when it comes to reducing the analysis time as well as aspects related to logistics. In the past few years, specific PCR tests in Real Time were developed for a variety of microorganisms (13, 14) with the purpose of improving the diagnosis. The possibility of monitoring PCR in real time revolutionized the process of quantification of DNA and RNA. PCR in real time performs the quantification of these nucleic acids in a precise way and with higher reproducibility, because it determines values during the exponential phase of the reaction. In the present study, a fluorescence-based PCR was used in real time, targeting the *inhA* gene of *M. tuberculosis* as the identification gene.

Standards were synthesized so that fluorescence could be monitored and used to generate a regression equation, enabling calculation of unknown samples. The cloning of the target sequence into vectors and their use as standards have been a frequent approach. Plasmid DNA can be obtained in elevated numbers and provide a long lasting source of material to be used for quantification. Owing to the ability of the technique to detect a wide range of numbers of DNA molecules, between 10^1 to 10^6 , the system presents great sensitivity.

Considering the fact that the patients were consecutively admitted during the period of the study's execution, it was not possible to make this comparison. That is because the smear test + is not considered in a first moment as a positive case for TB infection, still requiring the clinical exam along with another positive smear test to confirm TB diagnosis. No correlation could be established between the results of bacilloscopy and the absolute numbers of *M. tuberculosis* in the assays herein presented. Actually, there was a significant variation in the total numbers detected for every sample. As a matter of fact it must be recognized that most of the samples were within the +++ classification, which prevented a more precise association. However, it is noteworthy that the smear test may be prone to variations due to the fact it is based on direct counting of the cells. Analysis of the absolute numbers obtained for +++ showed variation that reached three orders of magnitude (2.8×10^7 to 1.11×10^5 cells), suggesting little correlation between the smear test and absolute numbers of *M. tuberculosis* based on real time quantification of DNA.

There are reports of mutations in the *inhA* gene reported among *M. tuberculosis* isoniazid-resistant strains, as the mutation S94A (11). This mutation is located in the site of connection of NADH with the InhA enzyme, reducing the affinity for the cofactor NADH (11). Because of that, the mutant protein has a higher K_i by the adduct INH-NADH, and it is more resistant to the inhibition than the wild enzyme (13). In the samples analysed, it would not be possible to identify resistant strains because they would be out of the amplification region covered by the primers/probe herein described. For the detection of mutant strains in the *inhA* gene, new primers and probe would be necessary, something that was beyond the scope of this study. In other words, the use of our primers/probe design to detect mutations in the *inhA* gene sequence would lead to false negative results. Our results showed a difference between the number of cells in culture detected by optical density and

PCR in Real-Time. This difference in cell numbers was probably due to the fact that, in culture, *M. tuberculosis* cells form aggregates (clumps) that affect proper reading in a cuvette (14), which points out to an underestimation of cell numbers calculated by spectrophotometry as opposed to direct DNA detection. This finding was corroborated by a larger variation of absolute numbers calculated by spectrophotometry as opposed to real time.

The mycobacterial DNA isolation technique used in this research involved various steps of purification, in conditions where the aggregates were not critical since the cells were efficiently lysed. Therefore, the analysis by PCR in Real-Time was more precise. It should be noted that the protocol described does not allow determination of the viability of the detected bacilli, considering that it detects genomic DNA only. To determine the viability, it would be necessary to perform RNA purification, reverse transcription, and then the same primers and probes should be used in DNA detection. In addition, the same protocol can be used in the implementation of a test to evaluate for presence of *M. tuberculosis* in macrophages that would be useful to test compounds with potential anti-TB effect.

Until the present moment there is limited number of reports relating the number of bacilli found in biological samples and DNA detection. Most research data are limited to the identification of *M. tuberculosis* (15,16), differentiation of species of the genus *Mycobacterium* (17), or yet the detection of paucibacillary samples (18,19), crucial to the identification in patients with TB meningitis in cerebrospinal fluid. One of the critical aspects in the detection of DNA traces in biological fluids is without a question the efficiency of the DNA purification from the sample. This is a critical step, since the DNA isolated from biological fluids in contaminated patients also contains DNA from other sources, such as oral bacteria and host cells. In this matter, approaches that could enrich

mycobacterial DNA obtained from such samples would be less prone to variations since efficiency of the amplification reaction would likely be higher.

In the present work, we showed the rationale of a method for detection and quantification of *M. tuberculosis* using the *inhA* gene as a model. As described, the approach has potential applications in clinical diagnosis and laboratory tests to evaluate anti-TB drugs as well. As shown, it has been able to detect a wide range of *M. tuberculosis* cell numbers, which calls attention to its use as a powerful tool in diagnosis. Further studies will focus on the detection of *M. tuberculosis* in paucibacilar TB cases and strategies to correlate absolute numbers of *M. tuberculosis* cells to smear tests.

References

1. World Health Organization. Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. WHO Report. 2007. Geneva, Switzerland: World Health Organization. P. 1-277.
2. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA. 1999;282(7):677-87.
3. Glickman MS, Jacobs Jr WR. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. Cell. 2001; 104(4):477-485
4. Kim MH, Yang HY, Suh JT, Lee HJ. Comparison of in-house PCR with conventional techniques and Cobas Amplicor M. tuberculosis kit for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. Yonsei Med J. 2008; 49(4):537-44.
5. Kivihya-Ndugga L, van Cleef M, Juma E, Kimwomi J, Githui W, Oskam L, et al. Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus. J. Clin. Microbiol. 2007; 42(3):1012-5.
6. Almeida J, Garcia A, González J, Quintó L, Ventura PJ, Vidal R et al. Clinical evaluation of an in house IS6110 polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2000; 19(11):859-67.
7. American Thoracic Society.. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 2000; 161:1376-95.
8. D'Amato RF, Wallman AA, Hochstein LH, Colaninno PM, Scardamaglia M, Ardila E, Ghouri M et al. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. J. Clin. Microbiol. 1995; 33(7):1832-1834.
9. Maiden, MC. Multilocus sequence typing of bacteria. Annu. Ver. Microbiol. 2006; 60: 561-88.
10. Greco S, Girardi E, Navarra A, Saltini C. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Thorax. 2006; 61(9):783-90.
11. Quémard A, Sacchetti JC, Dessen A, Vilchezes C, Bittman R, Jacobs Jr WR et al. Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. Biochemistry 1995; 34(26): 8235-8241.
12. Yun JJ, Heisler LE, Hwang II, Wilkins O, Lau SK, Hycza M, et al. Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. Nucleic Acids Res. 2006(12); 13:34-40.

13. Kramme S, Bretzel G, Panning M, Kawuma J, Drosten C. Detection and quantification of *Mycobacterium leprae* in tissue samples by real-time PCR. *Med. Microbiol. Immunol.* 2004; 193(4):189-93.
14. Palomares C, Torres MJ, Torres A, Aznar J, Palomares JC. Rapid detection and identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture specimens using real-time fluorescence PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2003; 45(3):183-9.
15. Vilchèze C, Wang F, Arai M, Hazbon MH, Colangeli R, Kremer L, et al. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis* *inhA* resolves the target of isoniazid. *Nat. Med* 2006; 12(9):1027-29.
16. McCammon MT, Gillette JS, Thomas DP, Ramaswamy SV, Graviss EA, Kreiswirth BN, Vijn J, et al. Detection of *rpoB* mutations associated with rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using denaturing gradient gel electrophoresis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49(6):2200-9.
17. Pao CC, Yen TS, You JB, Maa JS, Fiss EH, Chang CH. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(9):1877-80.
18. Shrestha NK, Tuohy MJ, Hall GS, Reischl U, Gordon SM, Procop GW. Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(11):5121-6.
19. Takahashi T, Nakayama T. Novel technique of quantitative nested real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(3):1029-39.
19. Takahashi T, Tamura M, Asami Y, Kitamura E, Saito K, Suzuki T, Takahashi S N, et al. Novel wide-range quantitative nested real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA: development and methodology. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(5):1708-15.

Culture	OD (number of cells)	Real-Time (number of cells)
1	0.284 (1.7×10^5)	1.64×10^5
2	0.216 (1.35×10^5)	1.81×10^5
3	0.174 (1.08×10^5)	1.78×10^5

TABLE 1 . Quantification of Mt cultures according to different methods

Sample	Bacilloscopy	Ct	Cells/ μ l	Cells/ml
1	+++	29	5.872	$5,87 \times 10^6$
2	+++	28.81	7.436	$7,43 \times 10^6$
3	+++	27.31	16.870	$1,68 \times 10^7$
4	+++	30.13	3.142	$3,14 \times 10^6$
5	+++	33.57	259	$2,59 \times 10^5$
6	+++	27.8	11.920	$1,19 \times 10^7$
7	+++	34.47	125	$1,25 \times 10^5$
8	+++	34.55	111	$1,11 \times 10^5$
9	++	32.56	409	$4,09 \times 10^5$
10	+++	31.97	761	$7,61 \times 10^5$
11	+++	30.29	2.441	$2,44 \times 10^6$
12	+++	25.12	28.085	$2,80 \times 10^7$
13	++	28.59	9.691	$9,69 \times 10^6$

*DNA collected from sputum as described in Material and Methods

TABLE 2. Quantification of biological samples based on the amplification of the *in*haA gene*.

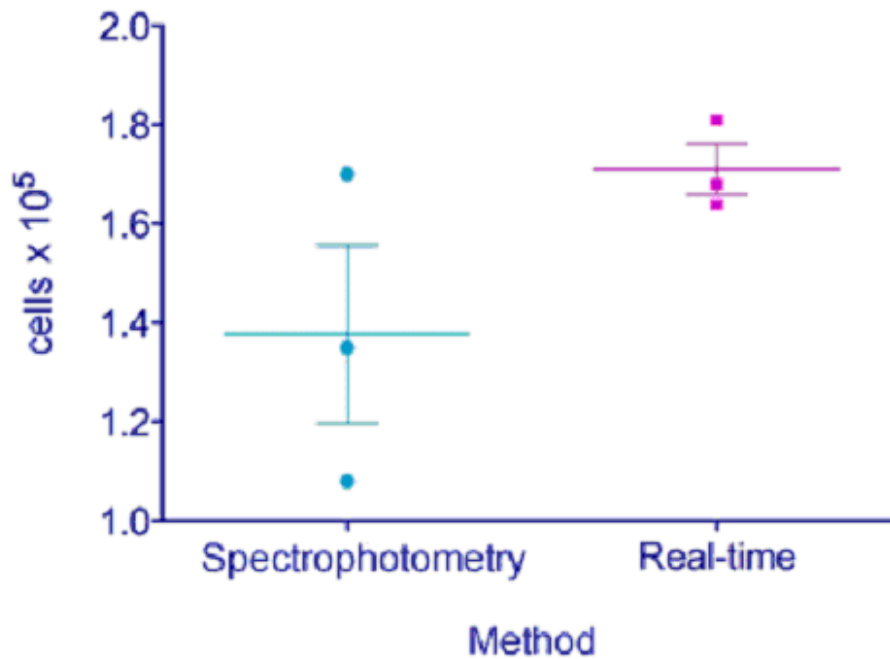
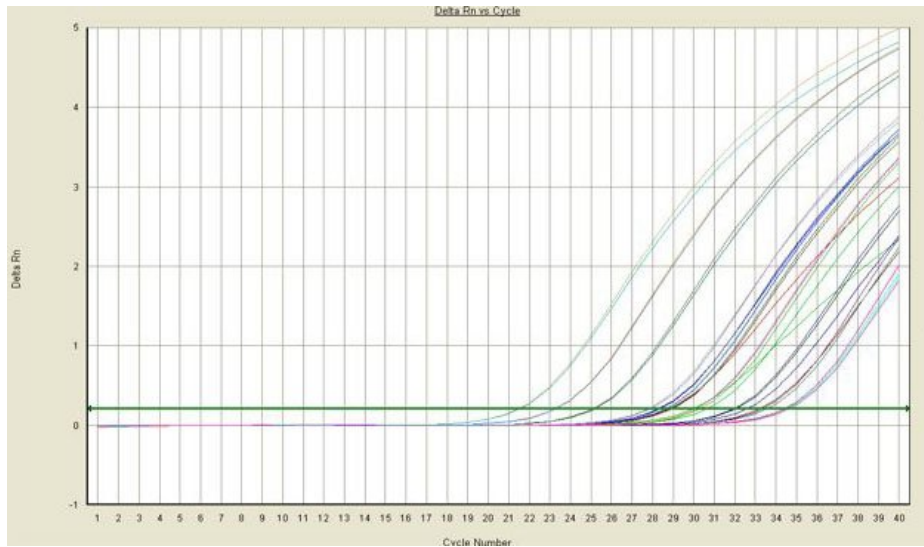


Figure 1. Scattered Plot of the Analysis of Mt numbers through OD and Real-Time. Results of three independent cultures show higher dispersion for samples analysed by spectrophotometry whereas Real-Time PCR provided more reproducible numbers of absolute DNA.

A



B

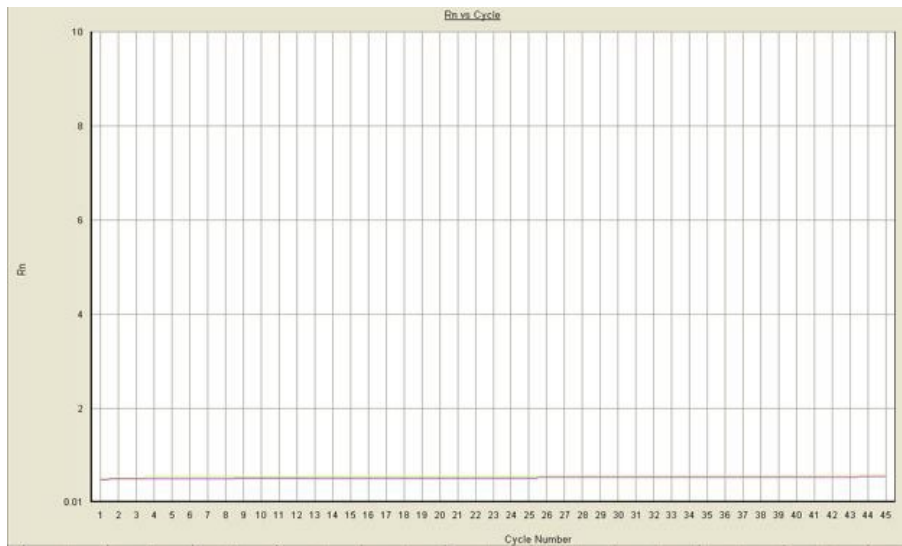


Figure 2. Amplification histogram plots of sample amplification. DNA isolated from patients diagnosed with TB was amplified, showing a important variation in the numbers based on cycle thrshold (a). DNA isolated from sputum of individual deemed healthy showed no signal (flat line), depicting absence of Micobacterium DNA (b).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É perturbante a maneira como a tuberculose é tratada nos dias de hoje: uma doença que mata uma pessoa a cada 16 segundos, com um teste diagnóstico com mais de 100 anos de idade, uma vacina que foi desenvolvida há aproximadamente 80 anos e drogas que não são modificadas há pelo menos 40 anos (59). Nos últimos anos houve uma modificação no perfil dos pacientes diagnosticados com tuberculose devido ao aumento do número de casos associados a AIDS (2). Com isso, as características epidemiológicas da tuberculose foram drasticamente alteradas, causando um aumento na dinâmica de transmissão, morbidade e mortalidade dos infectados. Assim, torna-se evidente que o aumento do número de casos de HIV, em pacientes anteriormente infectados por tuberculose favorece o surgimento de cepas capazes de resistir às principais drogas utilizadas no tratamento dos indivíduos infectados. Isso se soma à duração do tratamento, pois existe um maior índice de abandono do mesmo levando a disseminação destas linhagens para outras pessoas (6)

Devido as dificuldades para realizar testes com grande especificidade e com a devida agilidade, é proposto nesse trabalho o desenvolvimento e validação de um sistema para detecção e quantificação de *Mycobacterium tuberculosis* empregando o gene *inhA*. A abordagem testada pode ser utilizada como método diagnóstico a ser implementado em laboratórios como uma alternativa ou complemento aos métodos diagnósticos atualmente disponíveis que muitas vezes incidem em casos de falsos negativos, isto é, como no caso dos testes de tuberculina e da baciloscopia (60).

Atualmente, conta-se com desenvolvimento de métodos moleculares baseados, dentre outros, na reação da cadeia da polimerase em tempo real, utilizados para o diagnóstico

rápido e estudos de patogenicidade e epidemiologia de diversos tipos de doenças infecciosas.

Com a capacidade da técnica em quantificar o número de moléculas entre 10^1 a 10^6 e como cada cópia do gene *inhA* amplificado corresponde a um bacilo o sistema apresenta grande especificidade tendo a capacidade de detectar a baciloscopia + (uma cruz), que não é considerada num primeiro momento, um caso positivo para tuberculose, necessitando ainda do exame clínico e de mais uma baciloscopia positiva para confirmação do quadro.

Com uma pequena modificação no desenho de *primers* e sonda, seria possível a detecção de cepas mutantes no gene *inhA* na região de, algo que não foi o escopo deste trabalho. Isso significa que o gene *inhA* amplificado pelo sistema aqui descrito poderá ter incluído cepas com mutações. Isso se torna importante clinicamente, pois através da quantificação do número de moléculas de DNA de *Mt* presentes seja possível fazer um monitoramento paralelo dos efeitos da terapia em cepas mutantes, como nos casos das já anotadas para o gene *inhA* (61, 62).

Cabe salientar que o protocolo aqui descrito não permite a determinação da viabilidade dos bacilos detectados, visto que o mesmo detecta DNA genômico. Para determinação da viabilidade, seria necessário o isolamento de RNA e transcrição reversa para posterior quantificação. Esse processo pode ser implementado com relativa facilidade utilizando-se os mesmos *primers* e sondas empregadas na detecção do DNA, antecidos por uma etapa de transcrição reversa. Além disso, o mesmo protocolo pode ser empregado na implementação de um teste para avaliação da invasibilidade de macrófagos que seria útil no teste de compostos com potencial efeito anti-tuberculose .

Esse trabalho possibilitou a validação de um sistema para detecção e quantificação de *Mycobacterium tuberculosis* empregando o gene *inhA* utilizando PCR em tempo real, demonstrando uma possível utilização na clínica. Atualmente a técnica é limitada pelo alto custo dos reagentes e equipamentos.

5. REFERÊNCIAS

1. Fätkenheuer G., Taelman H., Lepage P., Schwenk A. & Wenzel, R. (1999). The return of tuberculosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 139-146.
2. Enarson D.A. & Murray J.F. (1996). Global epidemiology of tuberculosis. *In: Tuberculosis* (Rom, W.M. & Garay, S., Eds.), pp. 57-75. Little, Brown and Co., Boston, MA.
3. Pasqualoto K.F.M. & Ferreira E.I. (2001). An approach for the rational design of new antituberculosis agents. *Current Drug Targets* 2, 427-437.
4. Glickman M.S. & Jacobs W.R. Jr. (2001). Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell* 104, 477-485.
5. NSB Editorial comment. (2000). Taming tuberculosis-again. *Nature Structural Biology* 7(2), 87-88.
6. Brennan P.J. (1997). Tuberculosis in the context of emerging and reemerging diseases. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 18, 263-269.
7. Riley L.W. (1993). Drug-resistant tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases* 17(2), 442-446.
8. Nolan C.M. (1997). Nosocomial multidrug-resistant tuberculosis: Global spread of the third epidemic. *J. Infect. Dis.* 176, 748-751.
9. South African Press Association (2006 September 1) New deadly TB strain detected In SA. Disponível em:
http://www.iol.co.za/index.php?set_id=1&click_id=125&art_id=qw1157125502467B243.
Acessado em 01 de março de 2009.

10. Centers for Disease Control and Prevention (2006). Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs worldwide, 2000–2004. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* 55: 301–305.

Disponível em: <http://www.medicalnewstoday.com/medicalnews.php?newsid=40511>.
Acessado em 01 de março de 2009.

11. WHO (2006). Emergence of XDR-TB. WHO concern over extensive drug resistant TB strains that are virtually untreatable. Disponível em: http://www.who.int/tb/xdr/news_release_5september2006/en/index.html Acessado em 01 de março de 2009.

12. Gandhi N Moll A., Pawinski R., Zeller K., Lalloo U. *et al.* (2006). Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *The Lancet* 368(9547), 1554-6.

13. Singh J.A., Upshur R. & Padayatchi N. (2007). XDR-TB in South Africa: No Time for Denial or Complacency. *PLoS Med.* 4(1):e50, 19-25.

14. Bloom B.R. & Murray C.J.L. (1992). Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 257, 1055-1064.

15. Ayub A., Yale S.H., Reed K.D. (2004). Testing for latent tuberculosis. *Clin Med Res.* 2, 191-4.

16. Tubersol. Canada: Connaught; (1994). Disponível em: <http://www.drugs.com/mmx/tuberculin-purified-protein-derivative.html>. Acessado em 30 agosto de 2008.

17. Yeam Y.S., Jeong O.Y, Jang S.J., Moon D.S., Park Y.J. (1995). Comparasion of culture, acid-fast stain and polymerase chain reaction assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Korean J. Lab. Med.*15, 594-603.
18. Kivihya-Ndugga L., Cleef M. Juma E., Kimwomi J., Githui W., Oskam L., *et al.* (2007). Comparasion of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1012-5.
19. Almeida J., Garcia A., González J., Quintó L., Ventura P.J., Vidal R., *et al.* (2000). Clinical evaluation of an in house IS6110 polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*19, 859-67.
20. American Thoracic Society. (2000). Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 1376-95.
21. Kim J.H, Janf S.J., Moon D.S. Park Y.J. (2003). Evaluation of two PCR-hybridization methods for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Korean J. Lab. Med.* 23, 32-8.
22. Lee.K.E, Cho J.h, Moon Y.H. (1998). Comparasion of stain methods with PCR and culture for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum. *Korean J. Lab. Med.* 18, 201-7.
23. Shin W.S. (1992). Diagnosis of tuberculosis; serodiagnosis and molecular biologic approach in Korean. *Tuberc Respir Dis.* 39, 1-6.
24. Petrini B., & Hoffner S. (1999). Drug-resistant and multidrug-resistant tubercle bacilli. *International Journal of Antimicrobial Agents* 13, 93-97.

25. Gilbert G.L. (2002). Molecular diagnostics in infectious diseases and public health microbiology: cottage industry to postgenomics. *Trends in Molecular Medicine* 8(6), 280-287.
26. Achtman M. (1998). in *Molecular Medical Microbiology*, ed. Sussman, M. (Academic, London).
27. Mendelsohn J.A. (2002). Like all that lives: biology, medicine and bacteria in the age of Pasteur and Koch. *Hist. Philos. Life Sci.* 24, 3–36.
28. Krieg N.R., Brenner D.J. & Staley J.R. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Springer-Verlag.
29. Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A., Kampf P., *et al.* (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 52, 1043–47.
30. Achtman M., Morelli G., Zhu P, Wirth T., Diehl I., *et al.* (2004). Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 17837–42.
31. Keim P. & Smith K.L. (2002). *Bacillus anthracis* evolution and epidemiology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 271, 21–32.
32. Maiden M.C. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Ver. Microbiol.* 60, 561-88.
33. Urwin R. & Maiden M.C.J. (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 11, 479–487.
34. Silva L.A.F. & Passos N.S. (2002). DNA forense. Coleta de amostras biológicas em locais de crimes para estudos de DNA. Maceió:eduFAL, 84 p

35. Dieffenbach C.W. & Dveksler G.S. (1995). *PCR primer: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
36. Greco S., Girardi E., Navarra A., Saltini C. (2006). Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax*. 61(9), 783-90.
37. Kramme S., Bretzel G., Panning M., Kawuma J., Drosten C. (2004). Detection and quantification of *Mycobacterium leprae* in tissue samples by real-time PCR. *Med. Microbiol. Immunol.* 193(4), 189-93.
38. Palomares C., Torres M.J., Torres A., Aznar J., Palomares J.C. (2003). Rapid detection and identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture specimens using real-time fluorescence PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 45(3), 183-9.
39. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*. 10(4), 413-7.
40. Ginzinger D.G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.* 30(6), 503-12.
41. Mocellin S., Rossi C.R., Marincola F.M. (2003). Quantitative real-time PCR in cancer research. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 51(5), 301-13.
42. Rappolee D.A, Mark D., Banda M.J., Werb Z. (1988). Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science*. 241(4866), 708-12.
43. Bustin S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25(2), 169-93.

44. Sellars M.J, Vuocolo T., Leeton L.A., Coman G.J., Degnan B.M., Preston N.P. (2007). Real-time RT-PCR quantification of Kuruma shrimp transcripts: A comparison of relative and absolute quantification procedures. *J. Biotechnol.* 129(3), 391-9.
45. Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M.(1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6(10), 986-94.
46. Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88(16), 7276-80.
47. Quémard, A., Sacchettini, J. C., Dessen, A., Vilchézés, C., Bittman, R., Jacobs, W. R., Jr & Blanchard, J. S. (1995). Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 34, 8235-8241.
48. Dessen, A., Quémard, A., Blanchard, J. S., Jacobs, W. R., Jr & Sacchettini, J. C. (1995). Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 267, 1638-1641.
49. Cohn, D. L., F. Bustreo, and M. C. Raviglione. (1997). Drug-resistant tuberculosis: review of the worldwide situation and the WHO/IUATLD global surveillance project. *Clin. Infect. Dis.* 24, S121–S130
50. Vilchèze C., *et al.* (2000). Inactivation of the *inhA*-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 182(14), 4059-67.
51. Bernstein, J., W. A. Lott, B. A. Steinberg, and H. L. Yale. (1952). Chemotherapy of experimental tuberculosis. *Am. Rev. Tuberc.* 65, 357–374.

52. Fox, H. H. (1952). The chemical approach to the control of tuberculosis. *Science* 116, 129–134.
53. Takayama, K., L. Wang, and H. L. David. (1972). Effect of isoniazid on the in vivo mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2, 29–35
54. Winder, F. G., and P. B. Collins. (1970). Inhibition by isoniazid of synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Gen. Microbiol.* 63, 41–48
55. Takayama, K.; Wang, C.; Besra, G.S. (2005). Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microb. Rev.* 18(1), 81.
56. Brennan P.J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 83(1-3), 91-7.
57. Basso, L. A., and D. S. Santos. (2005). Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*—an update. *Med. Chem. Rev.* 2, 393-413.
58. Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quémard, A.; Balasubramanian, V.; Um, K.S.; Wilson, T.; Collins, D.; de Lisle, G.; Jacobs, W.R.Jr. (1994). inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 263(5144), 227-30.
59. Gagneux S. and Small P.M. (2007)+ Global Phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect. Dis.* 7, 328-37.
60. World Health Organization. Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. WHO Report (2007). Geneva, Switzerland: World Health Organization. 1-277.

61. Hellyer, T. J., T. W. Fletcher, J. H. Bates, W. W. Stead, G. L. Templeton, M.D. Cave, and K.D. Eisenach. (1996). Strand displacement amplification and the polymerase chain reaction for monitoring response to treatment in patients with pulmonary tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 173, 934-941.

62. Jami, S., J. T. Keer, S. N. Lucas, H. M. Dockrell, T. J. Chiang, R. Hussain, and N. G. Stoker. (1993). Use of polymerase chain reaction to assess efficacy of leprosy chemotherapy. *Lancet* 342, 264-268.

Anexo 1. Aprovação do projeto na Escola de Saúde Pública



ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
SECRETARIA DA SAÚDE

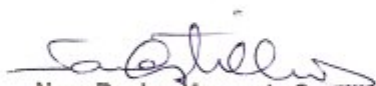
Of. CEP/ESP-049/2009

Porto Alegre, 25 maio de 2009.

Senhor(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética na Pesquisa em Saúde da Escola de Saúde Pública da Secretaria da Saúde do Rio Grande do Sul apreciou e **aprovou** o seu protocolo de pesquisa intitulado: "**Aplicação da Tecnologia MultiLocus Sequence Typin na tipagem de cepas de Mycobacterium tuberculosis**". Diante disso, considerou que o mesmo tem relevância para a ciência e encontra-se ético e metodologicamente adequado.

Solicitamos que, ao final da pesquisa, seja entregue uma via para esse Comitê.



Nara Regina Moura de Castilhos
Comitê de Ética na Pesquisa em Saúde

da ESP/SES/RS

A(o)
Pesquisador(a)
Adriano Amaral Montes D'Oca
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

N/C

Av. Ipiranga, 6311 - Bairro Partenon - CEP 90.610-001 - Porto Alegre - RS
Telefone: (51) 3901.1533 - Fax: 3901.1493 - E-mail: ceps-esp@saude.rs.gov.br

Anexo 2: Carta de submissão de artigo:

SGP - Sistema de Gestão de Publicações 8/6/09 5:17 PM



Usuário: Diogenes Santiago Santos

Sistema de Gestão de Publicações
Publication Administration System



SGP
Versão 2.2

Correio Autor Correio Autor

Correio Como Enviar Estágios Critérios Copyright Downloads DeCS MeSH Dados Cadastrais Encerrar

- ➔ Fora de Padrão 0
- ➔ Artigos não-concluídos 0
- ➔ Aguardando Aprovação 0
- ➔ Submetido pelo Autor 0
- ➔ Recebido pela Secretaria 1
- ➔ Enviado aos Revisores 0
- ➔ Devolvido para Correções 0
- ➔ Recusado 0
- ➔ Aprovado 0
- ➔ Publicado na Revista 0

Qtd

Enviado ao Editor Associado Total: 1

2016 - Desenvolvimento e implementação de um sistema para a detecção e quantificação absoluta de Mycobacterium tuberculosis usando o gene da proteína enoil redutase NADH-dependente (inhA).

Data da submissão: 19/7/2009 22:54:56 (Artigo Original)
Jornal Brasileiro de Pneumologia

 Pareceres e Comentários

 Versão em PDF

 Detalhe do Manuscrito

 Submeter novo Artigo para a
Jornal Brasileiro de Pneumologia

 Gerar Termo de Copyright

 Ajuda